

·论著·

激活脐血单个核细胞体外抗 白血病细胞株活性研究

李慧娟, 邹典定, 赵东赤, 张渝侯, 谷小华

(武汉大学中南医院儿科, 湖北 武汉 430071)

[摘要] 目的 探讨植物血凝素(PHA)、白细胞介素-2(IL-2)、抗 CD3 单克隆抗体(α CD3Ab)激活的脐血单个核细胞(CBMC)体外对 K562 的杀伤活性, 以及外源性刺激因子对 CBMC 的可溶性白细胞介素-2 受体(sIL-2R)含量的影响。方法 采集 CBMC 分别与不同刺激因子体外短期培养, 台盼蓝拒染法测效应细胞的增殖能力, ELISA 法检测上清液中 sIL-2R 的含量, ^3H -TdR 释放法测定效应细胞体外对 K562 靶细胞的杀伤活性。结果 脐血 PHA-CD3AK 细胞在体外培养 3 d 后增殖倍数、活化后上清液中 sIL-2R 的含量显著高于 PHA-LAK、CD3AK 和 LAK 细胞($P < 0.05$)。PHA-CD3AK 细胞体外对白血病细胞株 K562 细胞的细胞毒活性明显高于 PHA-LAK、CD3AK 和 LAK 细胞($P < 0.05$)。结论 脐血单个核细胞经 PHA、IL-2 和 α CD3Ab 激活后, 可有效形成 PHA-CD3AK 效应细胞, 其增殖活性、细胞毒性均高于 PHA-LAK、CD3AK 和 LAK 细胞。

[关键词] 脐血单个核细胞; 植物血凝素; 白细胞介素-2; 抗 CD3 单克隆抗体; 可溶性白细胞介素-2 受体; K562 细胞株

[中图分类号] R73-3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2001)06-0633-03

Anti-tumor Effect of Cord Blood Mononuclear Cells Activated by PHA, α CD3Ab and IL-2 in Vitro

LI Hui-Juan, ZOU Dian-Ding, ZHAO Dong-Chi, et al.

Department of Pediatrics, Zhongnan Hospital, Wuhan University, Wuhan 430071, China

Abstract: **Objective** To explore the cytotoxicity to K562 cells and the soluble interleukin-2 receptor (sIL-2R) level of cord blood, cord blood mononuclear cells (CBMC) activated by phytohemagglutinin (PHA), α CD3Ab and IL-2 in vitro. **Methods** By calculating the number of living cells in different culture medium systems, the proliferative capability of activated CBMC was measured. The level of sIL-2R in the supernatant of the cultured CBMC was measured using ELISA. Tumor cells necrosis induced by the effector cells was detected by the release of ^3H -TdR. **Results** After a 3-day culture in vitro, the proliferation, cytotoxicity and the level of sIL-2R in cord blood PHA-CD3AK cells were much greater than those in PHA-LAK, CD3AK and LAK cells ($P < 0.05$). **Conclusions** The results show that the synergistic enhancing role of PHA, IL-2 and α CD3Ab in CBMC activation and PHA-CD3AK cells have some advantages over PHA-LAK, CD3AK and LAK cells in the proliferation and cytotoxicity.

Key words: Cord blood mononuclear cell; Phytohemagglutinin; Interleukin-2; Anti-CD3McAb; Soluble interleukin-2 receptor; K.562 cell line

人脐血富含造血干细胞, 用于儿童移植具有移植成活率高, 移植抗宿主病轻等特点。已有研究表明, 脐血淋巴细胞亚群的组成和功能与成人外周血有显著的不同, 主要为初始淋巴细胞。这种功能

上的差异是否会影响脐血移植后的移植物抗白血病(GVL)效应是目前关注的焦点之一。体外经可溶性白细胞介素-2(soluble IL-2, sIL-2), 抗 CD3 单克隆抗体(anti-CD3Ab, α CD3 Ab)激活的 LAK 和

CD3-AK 在肿瘤过继免疫治疗作为抗肿瘤治疗中具有一定作用^[1,2]。本文通过联合使用 PHA, α CD3Ab 和 IL-2 体外刺激脐血单个核细胞 (cord blood mononuclear cells, CBMC), 探讨该活化细胞的增殖能力以及对 K-562 细胞的杀伤活性。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

PHA(广州生物医学公司); α CD3Ab、重组人白细胞介素-2 (rIL-2)、sIL-2R 试剂盒(北京邦定生物医学公司); RPMI 1640 (法国 GIBCO 公司); 淋巴细胞分离液(上海华精生物科技有限公司); ³H-TdR(湖北医科大学实验中心放免室); K562 细胞株(人红白血病细胞株)(武汉大学典型物培养中心)。

1.2 标本来源及 CBMC 制备

脐血标本 25 例取自本院产科和湖北省妇幼保健院正常分娩儿, 肝素抗凝, 经淋巴细胞分离液密度梯度离心分离 CBMC。

1.3 效应细胞的激活与培养

将 CBMC 以 1×10^6 /ml 细胞浓度加至含 10% 新生牛血清的 RPMI 1640 液中(青霉素 100 U/ml, 链霉素 100 μ g/ml)。实验分 4 组: ①sIL-2; ②PHA + sIL-2; ③sIL-2 + CD3Ab; ④PHA + sIL-2 + CD3Ab (PHA 终浓度为 125 μ g/ml, α CD3Ab 终浓度为 1 μ g/ml, IL-2 终浓度为 500 U/ml), 5% CO₂ 恒温培养箱中 37℃ 培养 72 h, 培养过程中不换液不传代。

1.4 效应细胞增殖活性和细胞毒活性的测定^[3]

台盼蓝拒染法记数各组培养 72 h 后的活细胞数; 用 ³H-TdR 释放法测定各组效应细胞体外对 K562 细胞株的杀伤活性。

杀伤活性 = $(1 - \text{实验组 cpm} / \text{对照组 cpm}) \times 100\%$

1.5 培养上清液中 sIL-2R 含量的测定

采用 ELISA 法, 4 组细胞于培养后留取上清液, 用酶标测定仪测 450 nm 处的 OD 值, 绘制标准曲线, 计算样品 sIL-2R 含量。

1.6 统计学处理

采用方差分析和配对 *t* 检验。

2 结果

2.1 效应细胞的增殖活性

采用台盼蓝拒染法计数活细胞数, 观察体外培养 3 d 后各效应细胞的增殖能力, 发现 PHA-

CD3AK 细胞的增殖能力明显高于 PHA-LAK, CD3AK 和 LAK 细胞 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 效应细胞体外杀伤活性的比较

K562 是一种对 NK 细胞、LAK 细胞和 CD3AK 细胞介导的细胞毒作用都敏感的靶细胞, 我们比较了本实验各组效应细胞对 K562 细胞的杀伤率。体外培养 3 d 后所测得的细胞毒活性依次为 PHA-CD3AK > CD3AK > PHA-LAK ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 4 组细胞体外培养 3 d 后的增殖倍数、杀伤活性的比较及培养后上清液 sIL-2R 含量

Table 1 Comparison of proliferation, cytotoxicity and the level of sIL-2R in the supernatant in 4 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	增殖倍数	杀伤率(%)	sIL-2R
LAK	1.02 ± 0.03	22.37 ± 9.62	246.5 ± 38.5
PHA-LAK	1.56 ± 0.04 ^a	46.24 ± 9.34 ^a	846.4 ± 143.7 ^a
CD3AK	1.12 ± 0.08 ^a	49.36 ± 10.24 ^a	931.8 ± 164.9 ^a
PHA-CD3AK	1.96 ± 0.12 ^{a,b,c}	56.17 ± 10.63 ^{a,b,c}	1385.7 ± 285.5 ^{a,b,c}

注: a 与 LAK 组比较 $P < 0.05$; b 与 CD3AK 组比较 $P < 0.05$; c 与 PHA-LAK 组比较 $P < 0.05$

2.3 上清液中 sIL-2R 含量的比较

未经激活的 CBMC 其上清液中 sIL-2R 含量基本检测不出来, 但激活后的含量则明显增高, 依次为 PHA-CD3AK > CD3AK > PHA-LAK ($P < 0.05$)。

3 讨论

肿瘤过继免疫治疗 (adoptive immunotherapy, AIT) 作为抗肿瘤治疗的重要方法一直受到人们的普遍关注, 80 年代初 Rosenberg 等报道用 IL-2/LAK 细胞治疗晚期恶性肿瘤获得一定疗效, 但是因为 LAK 细胞的增殖活性较低难以达到足够的细胞数, 并且大量输注 IL-2 对人体正常组织会产生严重的毒副作用, 因此限制了 LAK 细胞的临床应用^[1,4]。人们不断探求新型免疫效应细胞, 一些学者研究证实 PHA 和 IL-2 共同诱导的 PHA-LAK 与 α CD3Ab 和 IL-2 共同诱导的 CD3-AK 均比常规 LAK 细胞具有更高的增殖能力和杀伤活性^[5,6]。

本组资料显示, 将 PHA, α CD3Ab 和 IL-2 联合使用, 共同刺激外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMC), 该活化细胞的增殖能力和杀伤活性均比 CD3AK 和 PHA-LAK 细胞高。研究表明活化细胞为异质性细胞群体, 以 CD3⁺CD8⁺

细胞为主,有报道表明 CD8⁺ T 细胞采用 Fas-FasL 和穿孔素两种方式显示 CTL 活性,且这种杀伤活性为 MHC 非限制性^[7]。该文献研究显示 PHA, α CD3Ab 和 IL-2 联合有协同作用。现就各刺激因素的作用机制分述如下:IL-2 是促使 T 细胞从 G1 期转至 S 期的关键性因子,它通过酪氨酸激酶(protein tyrosine kinase, PTK)信号传导途径诱导 LAK 细胞的产生、分化和效应功能,并可诱导 LAK 细胞产生 INF- γ 和 TNF- α 等细胞因子,达到增强 LAK 细胞杀伤肿瘤细胞的作用^[8]。而 α CD3Ab 通过识别 T 细胞膜上的 TCR-CD3 复合物,经激酶 C(protein kinase C, PKC)途径介导,诱导 CD3AK 细胞的产生,并产生 TNF 和 IFN- γ 等细胞因子,达到活化和增强 CD3AK 细胞毒的作用,而且 α CD3Ab 还能刺激 T 细胞几乎 100% 进入细胞周期,明显增加细胞增殖数量^[8]。PHA 是一类非特异性淋巴细胞激活剂,通过 T 细胞膜上的 PHA 受体激活 T 细胞,PHA 和 CD3Ab 还可以促进 T 细胞表达 mIL-2R 并产生内源性的 IL-2,从而协同促进 T 细胞增殖,因此 PHA, α CD3Ab 和 IL-2 分别作用于淋巴细胞上的不同受体 PHAR, TCR/CD3 复合物和 IL-2R,并经不同的信号传导途径协同促进其增殖与分化。sIL-2R 是 mIL-2R 从膜上脱落而形成的,它可与游离 IL-2 结合而干扰 IL-2 与细胞的相互作用,从而调节免疫反应的强度。其含量的增高可认为是伴随较强细胞增殖的免疫反应的结果,因此可通过检测其含量的变化来了解被检测对象的免疫应答情况。

4 组中,以 PHA, α CD3Ab 和 IL-2 的效应细胞对 K-562 的杀伤效应最高,依次为 PHA-CD3AK > CD3AK > PHA-LAK > LAK ($P < 0.05$)。脐血与外周血相比在免疫学特性上有很大差异,脐血不能产生有效的抗原特异性细胞毒 T 细胞,但脐血淋巴细胞对 PHA 和 Con-A 等有丝分裂原有较好的反应性,脐血一旦活化能很快产生非特异性 NK 细胞样机制,而且 CBMC 比 PBMC 更易诱导 LAK 细胞活性,这可能是因为 CBMC 中有较多的 LAK 前体细胞,并且这种 LAK 细胞较易溶解 ALL, AML 和 CML 患者的白血病细胞。因此脐血淋巴细胞虽然以初始型为主,但经适宜刺激后仍能被有效活化^[9,10]。本文研究结果提示脐血与成人外周血一

样能被 PHA, IL-2 和 α CD3 激活为 PHA-CD3AK 细胞,并且脐血来源广泛,不易被细菌及病毒污染,其分离培养及扩增也较容易,故是十分理想的诱导抗肿瘤效应细胞的前体来源。CBMC 是一个复杂的多克隆淋巴细胞群体,不同克隆的肿瘤效应细胞对肿瘤的杀伤机制也不同,而细胞因子在体内呈现一种复杂的网络化调节。因此,协同刺激细胞的体内抗肿瘤作用及机制还有待于进一步探讨。

【参 考 文 献】

- [1] Grimm EA, Mazumder A, Zhang HZ, et al. Lymphokine-activated killer cell phenomenon. Lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cells by interleukin 2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes [J]. J Exp Med, 1982, 155(6): 1823-1841.
- [2] Ting CC, Myrthel EH, Yeon SY, et al. Augmentation by anti-CD3 antibody of the Lymphokine-activated killer cell-mediated cytotoxicity [J]. J Immunol, 1988, 141(3): 741-748.
- [3] 吴厚生,谢琪,姜小玲,等. ³H-TdR 释放法测量细胞介导的细胞毒功能 [J]. 上海免疫学杂志, 1987, 7(4): 230-232.
- [4] Rosenberg SA, Mule JJ, Spiess PJ, et al. Regression of established pulmonary metastases and subcutaneous tumor mediated by the systemic administration of high dose rIL-2 [J]. J Exp Med, 1985, 161(5): 1169-1188.
- [5] 范亚欣,程一都,郭连英,等. 增强 PHA-LAK 细胞诱导激活新途径的研究 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 1998, 5(1): 32-35.
- [6] Shen GX, Wang XL, Zhu HF, et al. Experimental study on anti-tumor effect of splenocytes induced by anti-CD3 McAb, PHA and IL-2 [J]. J Tongji Medical University, 1994, 14(1): 12-15.
- [7] Vignaux F, Viret E, Malissen B, et al. TCR/CD3 Coupling to Fas-based cytotoxicity [J]. J Exp Med, 1995, 181(2): 781-786.
- [8] Ting CC, Hargrove ME, Wang J, et al. Differential requirement of protein tyrosine and protein kinase C in the generation of IL-2-induced LAK cell and α CD3-induced CD3AK cell responses [J]. Cell Immunol, 1995, 160(2): 286-296.
- [9] Gardiner CM, Meara AO, Reen DJ, et al. Differential cytotoxicity of cord blood and bone marrow-derived natural killer cells [J]. Blood, 1998, 91(1): 207-213.
- [10] Garderet L, Duphy N, Douay C, et al. The umbilical cord blood alphabeta T-cell repertoire: characteristics of a polyclonal and naive but completely formed repertoire [J]. Blood, 1998, 91(1): 340-346.

(本文编辑:俞燕)